平成 17 年 9 月作成 (第 1 版)

FASTKIT エライザ Ver.II シリーズ

≪操作マニュアル≫

キットの内容

	品 名	容 量	数量
A	抗体固相化プレート(カバー付き)	96 ウェル (8 ウェル×12 列)	1 枚
B	標準溶液 (50ng/mL)	1.8mL	1 本
C	希釈用緩衝液	100mL	1 本
D	ビオチン結合抗体	150μL	1 本
E	酵素 (ペルオキシダーゼ) -ストレプトアビジン結合物	150μL	1 本
F	発色剤 (TMB)	12mL	1 本
G	反応停止液 (0.5N H_2SO_4)	12mL	1 本
H	濃縮洗浄液 (10 倍濃縮)	100mL	1 本
I	抽出用試薬① (20 倍濃縮)	50mL	1 本
J	抽出用試薬② (20 倍濃縮)	50mL	1 本
K	抽出用試薬③ (20 倍濃縮)	50mL	1 本

※『FASTKIT エライザシリーズ』からの変更点

A　抗体固相化プレート:　抽出方法の変更に伴い、使用している抗体が変更されています。
B　標準溶液:　外部施設にて調製された標準溶液を添付しています。
　　測定範囲が 1ng/mL～50ng/mL に変更されています。
C　希釈用緩衝液:　全ての測定項目に共通の組成に変更しました。
D　ビオチン結合抗体:　抽出方法の変更に伴い、使用している抗体が変更されています。
E　酵素-ストレプトアビジン結合物: 標識酵素を全項目ペルオキシダーゼに統一しました。
F　発色剤:　標識酵素の統一に伴い、全項目 TMB に統一しました。
G　反応停止液:　全項目硫酸に統一し、濃度を 0.5N に変更しました。
H　濃縮洗浄液:　『FASTKIT エライザシリーズ』と組成上の変更はありません。
I～J 抽出用試薬①～③:　加熱加工食品からの抽出効率向上のため組成を変更しました。
　　(株) 森永生科学研究所製キットと同一組成となっています。

注1)　組成が同一の試薬であっても、『FASTKIT エライザシリーズ』と『FASTKIT エライザ Ver.II シリーズ』の試薬を差し替えて使用することは避けてください。

必要な器具類

1. 測定溶液の調製(抽出操作)

器 具 名	使 用 目 的
粉砕機	食品サンプルを粉砕･均一化するために使用。 市販のフードカッター、ミルサーで代用可能。
秤	均一化した調製試料を 1g 秤量するために使用。
遠心管(要キャップ付)	50mL 容量のポリプロピレン製で、ディスポーザブルのものを推奨。 抽出操作用とろ過用として 1 検体あたり 2 本必要。
振とう機	水平方向に振とうし、振とうの回転数を調整可能な機種を使用すること。 ＜使用装置例＞ メーカー：東京理化器械株式会社 製品名：振とう機(マルチシェーカー) 型番：MMS-110，MMS-310，MMS-3010 価格：￥130,000～￥180,000(カタログ価格)
遠心分離機	3,000×g での遠心分離が可能な器具を推奨。冷却機能は不要。
ろ紙	通常のろ紙を使用すること。No.5A (ADVANTEC) に相当するものを推奨。
漏斗	ろ過操作に使用。漏斗を使用せずにろ紙のみでろ過操作を行うことも可能(7ページろ過操作写真参照)。
メスシリンダー、ビーカー	試薬類の調製に使用。

注1) 粉砕機等を介して、特定原材料が混入する可能性があります。必ず食品サンプルごとにカップと刃を交換してください。また、それらの洗浄についても下記に示した洗浄操作例を参考にして洗浄したうえで、確実に洗浄されていることを定期的に確認することを推奨します。

＜洗浄操作例＞

① 流水洗浄後、中性洗剤を用いてこすり洗いを行ってください。
② アルカリ洗剤中に一晩以上浸け置きしてください(超音波洗浄の併用を推奨します)。
③ 流水洗浄によりアルカリ洗剤を洗い流した後、精製水を用いて流水洗浄してください。

注2) 一日に処理する検体数は、粉砕器のカップと刃の数により決まります。そのため、一日の予測検体数に応じて、カップと刃を用意してください。

2. ELISA 操作

器 具 名	使 用 目 的
マイクロピペットおよびチップ	検体および試薬類の調製と測定溶液および試薬類の添加に使用。 100μL 以下用、1,000μL 以下用の 2 種類が必要。
試験管、マイクロチューブ	検体および試薬類の希釈に使用。
吸水紙(ペーパータオル)	洗浄操作時の水きりに使用。
プレートリーダー	ELISA 測定には必ず必要。 以下の測定波長での測定が可能なもの。 主波長：450nm／副波長：600～650nm
解析ソフト	プレートリーダー付属のもの。プレートリーダーの制御と、吸光度から濃度を算出するために必要。4係数Logistic解析(4-パラメーター)の計算が可能なもの。
プレートウォッシャー	洗浄操作を簡略化するために、使用することを推奨。
8 連マイクロピペット	測定溶液および試薬類のプレートへの添加作業を効率化するために使用することを推奨。
プレートミキサー	検体および試薬類を添加後、プレートを攪拌するために使用することを推奨。

FASTKITエライザVer. IIシリーズ操作の流れ

注1)　下記に推奨される操作の流れを示します。個々の操作における詳細な手順については、「測定溶液の調製手順」、「試薬の調製手順」、「測定操作手順」、および「データ解析」の項を参照ください。

1. 測定溶液の調製
① 検体抽出液を調製する。
② 食品サンプル1gに対し、検体抽出液19mLを加えて、室温で一晩振とうする。
③ 抽出試料を遠心分離し、上清を回収もしくはろ過する。
④ 回収した上清もしくはろ液を希釈用緩衝液で20倍希釈し、測定溶液を調製する。
2. 試薬の調製
① 抗体固相化プレート、希釈用緩衝液、発色剤、反応停止液を室温に戻す。
② 標準品希釈液を調製する。
③ 洗浄液を調製する。
④ 標準溶液を標準品希釈液で希釈し、希釈系列を作製する。
3. 測定操作（ELISA 操作）
① 室温に戻した抗体固相化プレートをアルミパウチ袋より取り出す。
② 希釈済み標準溶液及び測定溶液を 100μL/ウェル添加し、室温で 60 分間反応させる。
③ 洗浄操作
④ 希釈済みビオチン結合抗体溶液を 100μL/ウェル添加し、室温で 60 分間反応させる。
⑤ 洗浄操作
⑥ 希釈済み酵素-ストレプトアビジン結合物溶液を 100μL/ウェル添加し、室温で 30 分間反応させる。
⑦ 洗浄操作
⑧ 発色剤を 100μL/ウェル添加し、室温で 20 分間発色させる。
⑨ 反応停止液を 100μL/ウェル添加する。
⑩ プレートリーダーにて吸光度を測定する（450nm/600～650nm）
4. データ解析
① 標準溶液を測定して得られた吸光度から、4 係数 Logistic 解析（4-パラメーター解析）を用いて、標準曲線グラフを作成する。
② 作成した標準曲線グラフから、測定溶液中の特定原材料タンパク質濃度（ng/mL）を読み取る。
③ 読み取った特定原材料濃度（ng/mL）に抽出操作時の希釈倍率（400 倍）を乗じて、食品中の特定原材料タンパク質濃度（ppm）を算出する。

測定溶液の調製手順

1. 検体抽出液の調製

- 抽出操作だけでなく、標準品希釈液の調製にも使用します。
- 抽出用試薬①:②:③:精製水＝1:1:1:17の比率で混合し、よく攪拌してから使用して下さい。

＜調製例:24 検体測定する場合＞　　(ELISA 操作のみを行う場合)

抽出用試薬① (20 倍濃縮)	:	25mL	(1mL)
抽出用試薬② (20 倍濃縮)	:	25mL	(1mL)
抽出用試薬③ (20 倍濃縮)	:	25mL	(1mL)
精製水	:	425mL	(17mL)
検体抽出液	:	500mL	(20mL)

注1)　調製した検体抽出液の保存はできません。必ず要時調製してください。ただし、翌日の標準品希釈液調製等、測定操作に使用する場合には、冷蔵保存してください。

注2)　抽出用試薬①～③を用いて調製した検体抽出液は、(株) 森永生科学研究所製特定原材料測定キットと同一組成となるため、抽出後のろ液は両キットで共通に使用することができます。

注3)　抽出用試薬②は、冷蔵保存条件下では内容物が析出し沈殿を生じる場合があります。沈殿が認められる場合には、十分室温に戻したうえでよく攪拌し、沈殿を溶解させた後、使用して下さい。

注4)　抽出用試薬③および検体抽出液には、強い臭いを有する試薬が含まれています。毒物もしくは劇毒物に指定された試薬は含有されていませんが、換気には十分注意してください。

2. 食品サンプルの均一化(粉砕)

※　食品サンプルの均一化は、従来の『FASTKIT エライザシリーズ』と同一の方法です。

・　食品サンプルを粉砕器等により均一な状態に粉砕もしくはペースト状にしたものを調製試料とします。

＜使用器具例1：フードカッター(MK-K48;ナショナル)＞

＜使用器具例2：フードカッター(IFM-750G;岩谷産業)＞

注1)　均一化の目的は、食品中に特定原材料が偏って混入している可能性が高いため、食品を均一な状態にすることです。そのため、厚生労働省『アレルギー物質を含む食品の検査方法について』の中では、「食品サンプルの一包装単位をすべて破砕すること」と記載されています。

例1：カップラーメンでは、麺、かやく、スープをすべてまとめて均一化する。

例2：お弁当などでは、ご飯、惣菜、調味料などをまとめて均一化する。

注2)　同一の検体もしくは同一ロットの検体の再入手が困難な場合には、厚生労働省からの通知内容に反することになりますが、食品サンプル全てを均一化せず、一部を保管することを推奨します。また、お弁当などについても、食品企業では個々の内容に関して確認することが可能なため、ご飯、惣菜、調味料など個別に均一化することを推奨します。

注3)　粉砕後の調製試料は、再検査の実施のために保管しておくことを推奨します。保管方法、保存期間は食品サンプルにより異なります。

注4)　食品の種類、形態、成分に応じて条件検討が必要な場合があります。

例1：　液状の食品や粉末状の食品は均一化の必要はありません。

例2：　粘性の高い食品は均一化の操作が困難な場合があります。その場合は、はさみや包丁などでできるだけ細かく切り刻んでください。

3. 調製試料からのタンパク質の抽出

- 調製試料 1g をポリプロピレン製遠沈管に量り取ります。
- 調製済みの検体抽出液 19mL を加えます（検体抽出液の調製方法は「試薬の調製手順」の項を参照ください）。
- ボルテックスミキサーなどを用いて、固形分を均等に分散してください。
- 左図のように振とう機に遠沈管を横にしておき、室温で一晩（12 時間以上）振とうしたものを抽出試料とします。振とう条件は以下の通りです。

＜振とう条件＞

振とう回数：　90～110 往復/1 分間程度

振とう幅：　3cm 程度

注1)　調製試料を分散させる際には、あまり泡立たせないよう注意してください。

注2)　振とうの際には、振とうにより液が遠沈管の両端に打ち付けられるように調整してください。また、液面に沿って付着する調製試料を分散させるため、時々遠沈管の上下を入れ替えるなどの操作を行ってください。

注3)　食品の種類によっては、振とう時間を長くすることにより抽出効率が低下する場合があります。24 時間以上の振とうは避けてください。

注4)　食品の種類によっては、振とう時の温度の影響により、若干抽出効率が低下する可能性があります。できる限り室温に近い温度での振とうを推奨します。

注5)　抽出試料の pH を確認し、必要であれば、中性付近（pH6.0～8.0）に調整してください。ただし、これまでの検討から大部分の食品で pH 調整が必要ないことが確認されています。

注6)　食品の種類、形態、成分に応じて条件検討が必要な場合があります。

例1）液状の食品は抽出操作を行う必要はありません。

例2）粘性の高い食品や吸湿性の高い食品（ボルテックスミキサーでの攪拌が困難な検体）では、調製試料採取量を減らし、希釈倍率を上げて抽出操作を実施してください。調製試料＋検体抽出液の量が 20mL 以上となった場合、抽出効率に影響が生じる可能性があります。

4. 抽出試料の遠心分離

- 抽出試料中の不溶成分を除去するため、3,000×g，室温で 20 分間遠心分離します。
- 遠心後分離された上清を回収してください。その際に、可能であれば、油層を除去してください。

注1)　検体抽出液中には低温で沈殿を生じる物質が含まれているため、低温での遠心分離は行わないでください。

5. ろ過

遠心分離後に回収した上清をろ紙（No.5A, ADVANTEC 社製相当品）を用いてろ過をしてください。

注1) 取扱説明書では、遠心分離後沈査が得られない場合のみろ過を行うよう記載していますが、正確な結果を得るため、必ずろ過を実施することを推奨します。

注2) ろ液は『FASTKIT エライザ Ver.IIシリーズ』全ての測定項目で使用できます。また、（株）森永生科学研究所製特定原材料測定キットにも使用することが可能です。

注3) 回収した上清およびろ液は 4°C保存とし 1 週間以内に測定してください。1 週間以上保存を行う場合には冷凍保存してください。ただし、冷蔵もしくは冷凍での保存期間は食品中の成分の影響により異なります。

6. ろ液の希釈

- 回収した上清もしくはろ液を希釈用緩衝液で、20 倍希釈し測定溶液とします。

注1) 『FASTKIT エライザ Ver.IIシリーズ』の希釈用緩衝液は、全ての測定項目で同一組成のため、測定溶液は全ての測定項目で使用することができます。

注2) 測定溶液を 20 倍以上に希釈する場合には、20 倍まで希釈用緩衝液で希釈した後、標準品希釈液にて希釈してください。

試薬の調製手順

注1)　各試薬に記載されているロット番号の異なる試薬を混合、もしくは差し替えて使用しないでください。

注2)　ラベルに測定項目が記載されている試薬（抗体固相化プレート、標準溶液、ビオチン結合抗体、酵素-ストレプトアビジン結合物）は、他の測定項目に使用することはできません。

注3)　ラベルに測定項目が記載されていない試薬（希釈用緩衝液、発色剤、反応停止液、濃縮洗浄液、抽出用試薬①～③）は、全ての測定項目で共通に使用することができます。

注4)　分注、希釈などのピペット操作は測定精度に大きく影響を及ぼすため正確に行ってください。また、分注、希釈操作ごとにマイクロピペットのチップは必ず交換してください。

注5)　いずれの試薬もよく攪拌した上で使用してください。また、希釈操作後の試薬も必ず攪拌してください。

1. 抗体固相化プレート

- アルミパウチ袋に入れたまま室温に戻し、十分室温に戻っているのを確認した後、使用直前にアルミパウチ袋から取り出してください。
- 抗体固相化プレートは8ウェル×12ストリップに分割して使用することができます。使用しないストリップは乾燥剤入りのアルミパウチ袋に戻し、冷蔵保存してください。

注1)　抗体固相化プレートを室温に戻す際には、2時間以上室温に放置することを推奨します。

注2)　冷えた状態で抗体固相化プレートをアルミパウチ袋から取り出した場合、吸湿の影響により正しい結果が得られない可能性があります。

2. 希釈用緩衝液

- 標準品希釈液、測定溶液、ビオチン結合抗体、酵素-ストレプトアビジン結合物の調製及び希釈に使用します。
- 十分室温に戻っているのを確認した後使用してください。

注1)　希釈用緩衝液を室温に戻す際には、2時間以上室温に放置することを推奨します。

注2)　冷えた状態の希釈用緩衝液を使用した場合には、吸光度が低下する場合があります。

3. 標準品希釈液の調製　※要注意

- 標準溶液希釈系列の作成に使用します。
- 調製済みの検体抽出液を希釈用緩衝液で 20 倍に希釈して使用してください。

＜調製例：標準品希釈液を 20mL 調製する場合＞

検体抽出液	：	1 mL
希釈用緩衝液	：	19 mL
標準品希釈液	：	20 mL

注1)　従来の『FASTKIT エライザシリーズ』にはなかった試薬です。忘れずに調製してください。

注2)　標準品希釈液の調製に使用する検体抽出液は、抽出操作のために前日に調製した検体抽出液を使用してください。前日に調製した検体抽出液は冷蔵保存してください。

4. 標準溶液希釈系列の作成

・ 検体抽出液を希釈用緩衝液で 20 倍希釈した標準品希釈液を用いて、標準溶液（B：50 ng/mL）を下記の手順に従って倍々希釈し、希釈系列を調製して下さい。

＜標準溶液の希釈例＞

最終濃度(ng/mL)	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0
標準溶液（μL）	800	400	400	400	400	400	400	
標準品希釈液（μL）	0	400	400	400	400	400	400	400

＜希釈操作例＞

① 8 本のマイクロチューブもしくは試験管を用意し、各最終濃度を記載します。
② 最終濃度を記載した各容器に標準品希釈液を上記に示した所定量分注します。
③ 標準溶液をボルテックスミキサー等を用いてよく攪拌した後、標準溶液 800μL を 50ng/mL と記載した容器に添加し、よく攪拌して標準溶液 50ng/mL 溶液とします。
④ 次いで 50ng/mL 溶液 400μL を 25ng/mL と記載した容器に添加し、よく攪拌して標準溶液 25ng/mL 溶液とします。
⑤ 以下同様に 0.78125ng/mL までの希釈系列を作製してください。
⑥ 0ng/mL（ブランク）については、標準品希釈液のみを用いてください。

注1) 標準溶液の希釈は必ず検体抽出液を含む標準品希釈液で希釈してください。検体抽出液の濃度が変化することにより正しい結果が得られない可能性があります。

注2) 標準溶液は使用直前まで冷蔵保存し、使用後はただちに冷蔵保存してください。

注3) 標準溶液の希釈は要時調製として、測定ごとに検量線を作成して下さい。また希釈した標準溶液はできるだけ早く使用してください。

5. 洗浄液の調製

・ プレートの洗浄操作に使用します。
・ 濃縮洗浄液を精製水にて 10 倍希釈して使用してください。

注1) 洗浄液は要時調製する必要はありません。まとめて調製し室温で保存しておくことが可能です。ただし、洗浄液中に沈殿や濁りが認められる場合には、新たに調製してください。

6. ビオチン結合抗体溶液および酵素-ストレプトアビジン結合物溶液の調製

・ あらかじめ室温に戻した希釈用緩衝液にて 100 倍希釈して使用してください。
・ 希釈はプレートに添加する直前に行い、15 分以内に使用してください。

注1) 希釈用緩衝液を必要量（1mL/ストリップを目安としてください）分注し室温に戻しておき、使用直前にビオチン結合抗体もしくは酵素-ストレプトアビジン結合物を必要量添加することをお勧めいたします。

注2) ビオチン結合抗体および酵素-ストレプトアビジン結合物は、使用直前まで冷蔵保存し、使用後ただちに冷蔵保存してください。

7. 発色剤（TMB）

・ 必要量（1mL/ストリップを目安としてください）を遮光容器に分注し、十分室温に戻して使用してください。

注1) 遮光容器がない場合は、分注した容器をアルミホイルで完全に包み遮光してください。

8. 反応停止液

・ 必要量（1mL/ストリップを目安としてください）を分注し、十分室温に戻して使用してください。

注1) 反応停止液は高濃度の硫酸を使用しています。取り扱いには十分注意してください。

測定操作手順 (ELISA 操作手順)

※　測定操作は従来の『FASTKIT エライザシリーズ』と同一の方法です。

1. 標準溶液および測定溶液の添加

- 抗体固相化プレートを室温に戻し、アルミ袋から取り出します (「試薬の調製手順」の項を参照ください)。
- あらかじめ希釈した標準溶液および測定溶液を 100 µL/ウェル添加してください (標準溶液の希釈方法は「試薬の調製手順」を、測定溶液の調製方法は「測定溶液の調製手順」の項を参照ください)。標準溶液および測定溶液の配置は下記に示した検体配置例を参考にしてください。

＜検体配置例＞

	希釈済み標準溶液			測定溶液 (3 重測定×24 検体)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	標準溶液 (0ng/mL)			検体1			検体9			検体17		
B	標準溶液 (0.78ng/mL)			検体2			検体10			検体18		
C	標準溶液 (1.56ng/mL)			検体3			検体11			検体19		
D	標準溶液 (3.12ng/mL)			検体4			検体12			検体20		
E	標準溶液 (6.25ng/mL)			検体5			検体13			検体21		
F	標準溶液 (12.5ng/mL)			検体6			検体14			検体22		
G	標準溶液 (25ng/mL)			検体7			検体15			検体23		
H	標準溶液 (50ng/mL)			検体8			検体16			検体24		

- 標準溶液および測定溶液の添加後、プレートをよく攪拌してください。
- 室温 (20～25°C) で 60 分間静置して反応させてください。

注1)　標準溶液および測定溶液の添加時には、マイクロピペットのチップは標準溶液濃度ごとおよび測定溶液ごとに交換してください。また、ウェルの底にはチップを触れないよう注意してください。

注2)　標準溶液および測定溶液の測定には、測定誤差を確認するため 3 重測定することを推奨します。また、標準溶液の測定は測定ごとに必ず実施してください。

注3)　プレートの攪拌時は、ウェル内の試料溶液が飛び跳ねないよう注意してください。マイクロプレート振とう機を使用することを推奨します。

注4)　反応時には乾燥や埃等の混入を防ぐためプレートカバーをしてください。また、空調やインキュベーターからの風が直接プレートに当たらないよう注意してください。

2. 洗浄操作

- 標準溶液および測定溶液を廃棄してください。
- あらかじめ調製した洗浄液を 250μL/ウェル添加してください。
- 添加した洗浄液を再度廃棄してください。洗浄液の添加と廃棄を 5 回繰り返してください。
- 洗浄液の添加と廃棄を 5 回繰り返した後、左写真のようにペーパータオルなどにプレートを叩きつけ、ウェル中の洗浄液が完全に除去されるまで水切りを行ってください。

注1) 液を廃棄する際には、ウェル間での液の混入や廃棄した液の跳ね返りに注意しながら、プレートを逆さにし、1～2 回上下に強く振ってください。

注2) ウェルが空の状態、および洗浄液を満たした上で長時間放置した場合、反応が低下する可能性があるため、手早く作業を行ってください。手早く作業を行うため、8 連マイクロピペットや連続分注器を使用することを推奨します。

注3) 水切り操作は、洗浄液を捨てるたびに実施する必要はありません。5 回の洗浄操作の最後のみ実施してください。

注4) 水切りが不足することにより、吸光度の異常やバラツキの増大など測定結果に影響が生じます。ペーパータオルに水滴がつかなくなるまで水切りを行ってください。

注5) ウェル中に残った細かい気泡は測定結果に影響を及ぼすことはありません。ただし、ウェル全面を覆っている気泡やウェルよりはみ出している気泡については、再度洗浄液の分注から行い除去してください。

注6) 洗浄操作の簡略化および測定者間差を小さくするため、プレートウォッシャーの使用を推奨します。ただし、プレートウォッシャーを使用した場合でも水切りはかならず行ってください。

3. ビオチン結合抗体の添加

- あらかじめ必要量（1mL/ストリップを目安としてください）を分注し、室温に戻しておいた希釈用緩衝液にビオチン結合抗体を加え 100 倍希釈してください。ビオチン結合抗体の添加量は希釈用緩衝液 1mL に対し 10μL を目安としてください。
- 希釈したビオチン結合抗体を 100μL/ウェル添加し、よくプレートを攪拌してください。
- 室温（20～25℃）で 60 分間静置して反応させてください。

注1) 希釈したビオチン結合抗体は、抗体の劣化による吸光度の低下を防ぐため、希釈後 15 分以内に使用してください。

注2) プレートの乾燥を防ぐため、8 連マイクロピペットや連続分注器を使用して手早く添加してください。また、添加時にはウェルの底にチップが触れないよう注意してください。

注3) プレートの攪拌時は、ウェル内の試料溶液が飛び跳ねないよう注意してください。マイクロプレート振とう機を使用することを推奨します。

注4) 反応時には乾燥や埃等の混入を防ぐためプレートカバーをしてください。また、空調やインキュベーターからの風が直接プレートに当たらないよう注意してください。

4. 酵素-ストレプトアビジン結合物の添加

- 手順2に示した洗浄操作と同様にプレートを洗浄してください。
- あらかじめ必要量（1mL/ストリップを目安としてください）を分注し、室温に戻しておいた希釈用緩衝液に酵素-ストレプトアビジン結合物を加え 100 倍希釈してください。酵素-ストレプトアビジン結合物の添加量は希釈用緩衝液 1mL に対し 10μL を目安としてください。
- 希釈した酵素-ストレプトアビジン結合物を 100μL/ウェル添加し、よくプレートを攪拌してください。
- 室温（20～25℃）で 30 分間静置して反応させてください。

注1) 希釈した酵素-ストレプトアビジン結合物は、酵素の劣化による吸光度の低下を防ぐため、希釈後 15 分以内に使用してください。

注2) プレートの乾燥を防ぐため、8 連マイクロピペットや連続分注器を使用して手早く添加してください。また、添加時にはウェルの底にチップが触れないよう注意してください。

注3) プレートの攪拌時は、ウェル内の試料溶液が飛び跳ねないよう注意してください。マイクロプレート振とう機を使用することを推奨します。

注4) 反応時には乾燥や埃等の混入を防ぐためプレートカバーをしてください。また、空調やインキュベーターからの風が直接プレートに当たらないよう注意してください。

5. 発色剤の添加

- 手順2に示した洗浄操作と同様にプレートを洗浄してください。
- あらかじめ必要量（1mL/ストリップを目安としてください）を分注し、室温に戻しておいた発色剤を 100μL/ウェル添加し、よくプレートを攪拌してください。
- 室温（20～25℃）で 20 分間静置して反応させてください。
- 左図のように発色剤の添加により青色の発色が認められます。

注1) プレートの乾燥を防ぐため、8 連マイクロピペットや連続分注器を使用して手早く添加してください。また、添加時にはウェルのそこにチップが触れないよう注意してください。

注2) プレートの攪拌時は、ウェル内の試料溶液が飛び跳ねないよう注意してください。マイクロプレート振とう機を使用することを推奨します。

注3) 反応時には乾燥や埃等の混入を防ぐためプレートカバーをしてください。また、空調やインキュベーターからの風が直接プレートに当たらないよう注意してください。

注4) 発色時の遮光は必ずしも必要ではありませんが、データの再現性を高めるため、遮光条件下での発色を推奨します。直射日光が当たる場所での発色は避けてください。

6. 反応停止液の添加

- あらかじめ必要量（1mL/ストリップを目安としてください）分注し、室温に戻しておいた反応停止液100μL/ウェルを発色剤の上から添加し、よくプレートを攪拌してください。
- 反応停止液の添加により、左図のように青色から黄色の発色に変化します。

注1) 反応停止液は高濃度の硫酸を使用しています。取り扱いには十分注意してください。

注2) 抗原（特定原材料由来タンパク質）が高濃度で存在する場合、反応停止液の添加により黒色の粒子が発生する場合があります。この場合は測定結果に関わらず 50ng/mL 以上と判定してください。

7. 吸光度測定

・ プレートリーダーを用いて、主波長 450nm／副波長 600～650nm の測定波長により吸光度の測定を行ってください。

注1) 吸光度測定は、反応停止液添加後 30 分以内に実施してください。時間の経過と共に吸光度が低下する可能性があります。

データ解析

1. 標準曲線グラフ（検量線）の作成

・ 希釈した標準溶液を測定して得られた吸光度から、4 係数 Logistic 解析（4-パラメーター解析）により、標準曲線グラフ（検量線）を作成してください。

注1) 4 係数 Logistic 解析を行うためには、プレートリーダー付属の解析ソフトが必須となります。エクセル等の表計算ソフトでは 4 係数 Logistic 解析は実施できません。

注2) 解析ソフトの設定により、測定実施後自動的に標準曲線グラフが作成されます。

注3) 作成した標準曲線グラフからエライザ測定の可否判断を行うことを推奨します。判断基準は以下の項目を参考としてください。

a) 0ng/mL 吸光度が 0.15abs 以下である。
b) 50ng/mL 吸光度が 1.0abs 以上である。
c) 0ng/mL を除く各濃度の CV 値が 10%以下である。

2. 抗原タンパク質濃度の確認

・ 作成した標準曲線から、検体の吸光度に対応する抗原タンパク質濃度（ng/mL）を確認してください。

注1) 解析ソフト上で抗原タンパク質は自動的に算出されます。

3. 食品中濃度の算出

・ 読み取った抗原タンパク質濃度に対して、測定溶液調製時の希釈倍率（通常は 400 倍となります）を乗じて食品中濃度（ppm）を算出してください。

注1) 『FASTKIT エライザ Ver.II シリーズ』の測定下限は、標準曲線グラフの 0ng/mL との有意差が得られる濃度となります。標準曲線上の濃度には設定されていませんが、概ね 2.5ng/mL（食品中濃度：1ppm）以上であれば 0ng/mL との有意差が得られることが確認できています。

NIPPONHAM
日本ハム株式会社　中央研究所
〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3
TEL：029-847-7825 FAX：029-847-7824
URL：http;//www.rdc.nipponham.co.jp